



Sari buah mangga



Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

© BSN 2009

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Komposisi	1
4 Syarat mutu	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Penandaan.....	3
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh sari buah mangga	4
Lampiran B (normatif) Cara uji sari buah mangga.....	8
Bibliografi.....	40
Gambar B.1 - Metoda pengenceran	24
Tabel 1 - Syarat mutu sari buah mangga	1
Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	5
Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	6
Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg	6
Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	7
Tabel B.1 - Koreksi Pembacaan Refraktometer dengan Skala Indikasi Sukrosa untuk perbedaan suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	11
Tabel B.2 - Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut (sukrosa).....	12
Tabel B.3 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC.....	28
Tabel B.4 - APM/mL contoh bila menggunakan 3 tabung	29
untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 mL; 0,01 mL; dan 0,001 mL contoh	29
Tabel B.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i>	37
Tabel B.6 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella</i>	38

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Sari buah mangga* ini merupakan standar yang baru.

Maksud dan tujuan penyusunan standar ini adalah sebagai acuan sehingga sari buah mangga yang beredar di pasar dapat terjamin mutu dan keamanannya.

Didalam merumuskan SNI ini tim telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
2. Undang-undang RI No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan
4. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam dalam Makanan.
5. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan.

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 67 -04 Makanan dan Minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat konsensus pada tanggal 31 Januari 2007. Hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari konsumen, produsen, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, laboratorium uji serta instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 4 Agustus 2007 sampai dengan 4 Oktober 2007, dan proses pemungutan suara pada tanggal 4 Agustus 2008 sampai dengan 4 Oktober 2008 namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 4 November 2008 dengan hasil RASNI.

Sari buah mangga

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji yang digunakan untuk sari buah mangga.

2 Istilah dan definisi

2.1

sari buah mangga

cairan yang diperoleh dari daging buah mangga matang dan segar, dihancurkan, dapat dipasteurisasi atau tidak dan dikemas untuk dapat dikonsumsi langsung. Sari buah mangga dapat dikonsentrasikan atau direkonstitusi dengan air yang sesuai dengan tujuan mempertahankan komposisi esensial dan faktor mutu dari sari buah. Penambahan bahan tambahan pangan sesuai yang diizinkan

3 Komposisi

3.1 Bahan baku utama

Buah mangga

3.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan (kecuali pewarna) dapat ditambahkan pada produk sari buah mangga sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4 Syarat mutu

Syarat mutu sari buah mangga sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu sari buah mangga

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Warna	-	Kuning - jingga
1.2	Aroma	-	Normal
1.3	Rasa	-	Normal
2	Padatan terlarut (b/b)	%	Min. 13,5
3	Bahan tambahan pewarna	-	negatif
4	Cemaran logam		

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
4.1	Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks. 5,0
4.2	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 0,3
4.3	Timah (Sn)*	mg/kg	Maks. 150,0*
5	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,2
6	Cemaran mikroba		
6.1	Angka lempeng total	koloni/mL	Maks. 1×10^4
6.2	Bakteri <i>coliform</i>	APM/mL	Maks. 20
6.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/mL	<3
6.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/mL	0
6.5	<i>Salmonella</i>	koloni/25 mL	Negatif
6.6	Kapang/khamir	koloni/mL	Maks. 5×10^1
*) dikemas dalam kaleng			

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai untuk produk makanan sebelum dikemas sesuai Lampiran A.

6 Cara uji

Cara uji untuk semua parameter syarat mutu sari buah mangga seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh uji seperti pada Lampiran B.1.
- Cara uji keadaan seperti pada Lampiran B.2.
 - Cara uji warna seperti pada Lampiran B.2.1.
 - Cara uji aroma seperti pada Lampiran B.2.2.
 - Cara uji rasa seperti pada Lampiran B.2.3.
- Cara uji padatan terlarut seperti pada Lampiran B.3.
- Cara uji bahan tambahan pewarna seperti pada Lampiran B.4.
- Cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran B.5.
 - Cara uji tembaga (Cu) dan timbal (Pb) seperti pada Lampiran B.5.1.
 - Cara uji timah (Sn) seperti pada Lampiran B.5.2.
- Cara uji cemaran arsen (As) seperti pada Lampiran B.6.
- Cara uji cemaran mikroba seperti pada Lampiran B.7.
 - Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, bakteri *coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, kapang/khamir seperti pada Lampiran B.7.1.
 - Cara uji angka lempeng total (metode *plate count*) seperti pada Lampiran B.7.2.
 - Cara uji bakteri *coliform* dan *Escherichia coli* seperti pada Lampiran B.7.3.
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* (metode *plate count*) seperti pada Lampiran B.7.4.

- Cara uji Salmonella seperti pada Lampiran B.7.5.
- Cara uji kapang/khamir seperti pada Lampiran B.7.6.

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 4.

8 Higiene

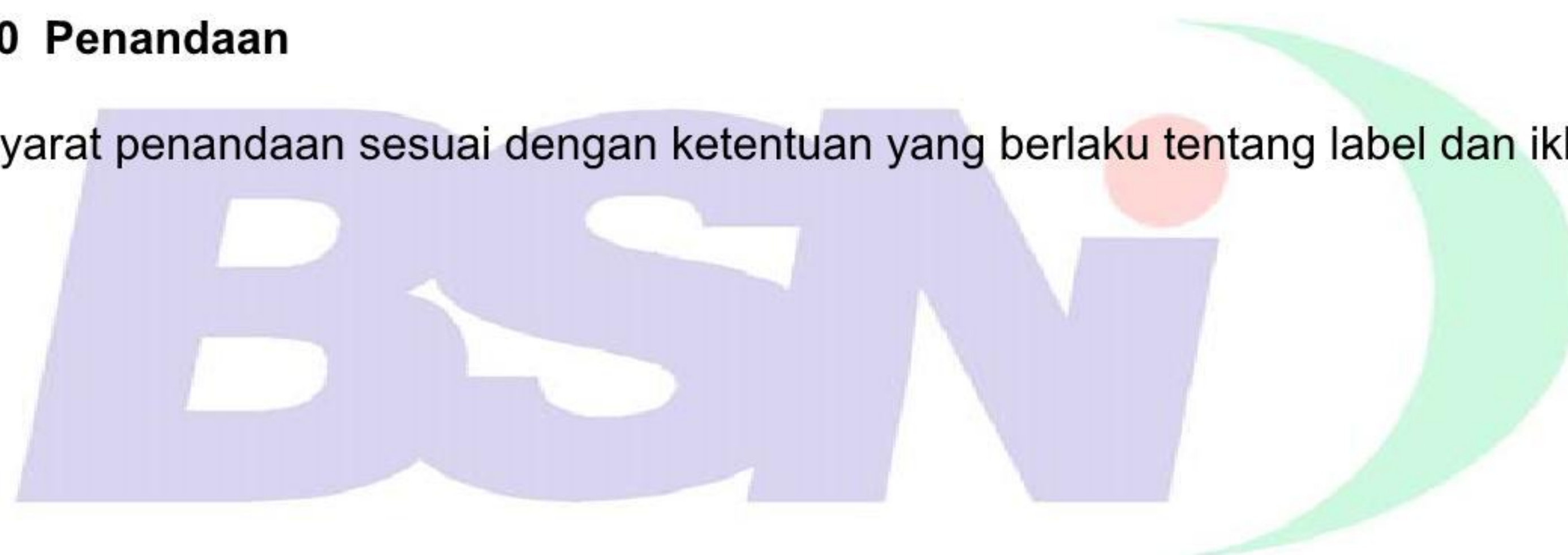
Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan yang Baik.

9 Pengemasan

Sari buah mangga dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A (normatif)

Cara pengambilan contoh sari buah mangga

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh sari buah mangga yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL (*Acceptance Quality Limit*) 6,5 dan contoh diambil secara acak.

A.2 Penerapan pengambilan contoh

A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- Tingkat inspeksi;
- Ukuran lot (N);
- Ukuran kemasan terkecil (isi bersih dalam mL);
- Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

A.2.2 Inspeksi

- Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:
tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).
tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih meyakinkan.
- Tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil sari buah mangga;
- Tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1.;
- Ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot;
- Uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar;
- Gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A;
- Nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama dengan atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c).

A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton yang berisi kemasan berukuran 12 x 400 mL setiap kartonnya. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- a) ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
 b) ukuran kemasan : 400 mL
 c) tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.3.1)
 d) ukuran contoh (n) : 13
 e) jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama dengan atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama (A.2.3.1) mendapat sanggahan maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a) ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
 b) ukuran kemasan : 400 mL
 c) tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.3.2)
 d) ukuran contoh (n) : 21
 e) jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, jumlah maksimum cacat yang diterima sebanyak 4 atau 6.

A.3 Rancangan pengambilan contoh

A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

**Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6,5)

Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

**Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb)
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19



Lampiran B (normatif)

Cara uji sari buah mangga

B.1 Persiapan contoh

Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh diupayakan dari kemasan yang sama.

B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Kocok kemasan sari buah mangga hingga contoh di dalamnya homogen. Buka kemasan sari buah mangga dan ambil contoh sari buah mangga minimum 100 mL secara aseptik dengan menggunakan pipet steril kemudian tempatkan dalam botol contoh. Jika ukuran kemasan kurang dari 100 mL maka ambil beberapa kemasan sehingga jumlah sari buah mangga menjadi 100 mL .

B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia

Campur isi kemasan contoh sari buah mangga dan ambil contoh uji minimum 200 mL secara hati-hati dengan menggunakan pipet yang bersih dan kering kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering. Jika ukuran kemasan kurang dari 200 mL maka ambil beberapa kemasan sehingga jumlah sari buah mangga menjadi 200 mL

B.2 Keadaan

B.2.1 Warna

B.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan (mata).

B.2.1.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji kira-kira 100 mL dan isikan ke dalam gelas plastik atau kaca bening yang bersih dan kering;
- Amati contoh uji untuk mengetahui warnanya;
- Lakukan pengerjaan oleh minimal 3 orang panelis.

B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- Warna sari buah mangga berkisar mulai dari kuning hingga jingga
- Jika warna sari buah mangga tidak termasuk kuning hingga jingga maka disebutkan warna yang diamati dan hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.2 Aroma

B.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

B.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji kira-kira 100 mL yang telah selesai diamati warnanya;
- Cium contoh uji pada jarak 7 cm hingga 10 cm dari hidung untuk mengetahui baunya;
- Lakukan pengerjaan oleh minimal 3 orang panelis.

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tercium bau khas sari buah mangga maka hasil dinyatakan "normal";
- Jika tercium bau asing selain bau khas sari buah mangga maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.3 Rasa

B.2.3.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera perasa (lidah dan organ-organ lain dalam rongga mulut).

B.2.3.2 Cara kerja

- Ambil kira-kira 100 mL contoh uji yang sudah selesai diamati aromanya;
- Masukkan contoh uji sebanyak ± 50 mL ke dalam mulut dan dikumur perlahan-lahan selama ± 30 detik hingga contoh uji merata di dalam rongga mulut. Lalu telan perlahan-lahan sambil dirasakan rasa contoh uji yang terasa (asam, manis, pahit, getir) serta *after taste* yang terasa di kerongkongan;
- Lakukan pengerjaan oleh minimal 3 orang panelis.

B.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- Jika terasa khas sari buah mangga (manis dan/atau asam) maka hasil dinyatakan "normal";
- Jika terasa rasa asing selain rasa khas sari buah mangga maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.3 Padatan terlarut

B.3.1 Prinsip

Indeks bias larutan contoh diukur pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ menggunakan refraktometer. Nilai indeks bias setara dengan jumlah padatan terlarut (dihitung sebagai konsentrasi sukrosa) menggunakan tabel, atau langsung dibaca pada refraktometer yang mempunyai skala nilai padatan terlarut.

B.3.2 Perekasi

- air

air yang digunakan harus disuling dua kali dalam alat gelas borosilikat, atau yang setara dengan kemurniannya.

B.3.3 Peralatan

a) Refraktometer

Dapat menggunakan salah satu dari alat berikut ini :

a.1 Refraktometer yang menunjukkan indeks bias dengan skala 0,001 agar mampu membaca hingga kira-kira 0,0002. Refraktometer ini diatur agar indeks bias pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk air suling menunjukkan nilai 1,3330.

a.2 Refraktometer yang menunjukkan nilai sukrosa dengan skala 0,10%. Refraktometer ini diatur agar nilai padatan terlarut (sukrosa) air suling menunjukkan nilai 0.

b) Alat untuk sirkulasi air, alat ini berguna untuk mempertahankan suhu pada prisma refraktometer tetap stabil sekitar $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ agar nilai perbedaan suhu selain $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dapat dihitung menggunakan tabel koreksi.

c) Gelas piala 250 mL.

B.3.4 Cara kerja

a) Timbang dengan teliti hingga 40 g contoh ke dalam gelas piala dan tambahkan 100 mL sampai 150 mL air. Panaskan hingga mendidih selama 2 menit sampai 3 menit, aduk dan dinginkan. Biarkan 20 menit lalu timbang dan di saring.

b) Pastikan peralatan telah dipersiapkan dan diteliti menurut buku panduan alat dan bersihkan permukaan prisma lalu keringkan.

c) Alirkan air pengontrol untuk mendapatkan suhu yang diharapkan (antara $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), biarkan air mengalir melalui mantel prisma refraktometer pada jangka waktu tertentu supaya terjadi keseimbangan suhu ± 5 menit (prisma dalam keadaan tertutup).

d) Pindahkan satu tetes air ke prisma refraktometer untuk menentukan titik nol atau digunakan sebagai koreksi.

e) Ambil larutan contoh dan atur suhu yang diinginkan. Teteskan (2 tetes sampai 3 tetes) larutan contoh ke dalam prisma refraktometer, buat larutan menyebar ke permukaan prisma dan segera atur tombol untuk mengatur prisma. Penggunaan lampu uap natrium akan mendapatkan hasil yang lebih tepat (khususnya untuk produk yang berwarna/gelap).

f) Baca refraktometer sesuai petunjuk buku panduan alat.

g) Gunakan beberapa skala koreksi untuk mendapatkan pembacaan terkoreksi.

CATATAN 1 Apabila dikerjakan pada suhu selain $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ maka pembacaan harus dikoreksi dengan tabel koreksi pada Tabel B.1

CATATAN 2 Contoh sari buah yang tidak terlalu kental dapat diamati langsung padatan terlarutnya dengan cara langsung meneteskan larutan contoh uji yang sudah dikocok hingga homogen (B.3.4.e)

B.3.5 Penyajian hasil uji

Koreksi

jika dibaca pada suhu selain dari $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ maka koreksinya menggunakan rumus sebagai berikut :

a) Untuk refraktometer yang menggunakan skala indeks bias digunakan rumus :

$$n_D^{20} = n_D^t + 0,0013(t - 20)$$

dengan:

n_D^{20} adalah indeks bias pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C}$;

n_D^t adalah indeks bias pada suhu pengukuran;

t adalah suhu dalam $^{\circ}\text{C}$.

b) Untuk refraktometer yang menggunakan skala % sukrosa, koreksi hasil dengan menggunakan Tabel B.1

B.3.6 Perhitungan

a) Refraktometer dengan skala indeks bias :

Baca padatan terlarut dari Tabel B.2 , koreksi jika perlu.

$$\% \text{ pada tan terlarut} = \frac{(P \times m_1)}{m_0}$$

dengan :

P adalah padatan terlarut yang diencerkan (%)

m_0 adalah bobot contoh sebelum dilarutkan (g)

m_1 adalah bobot contoh setelah dilarutkan (g)

b) Refraktometer dengan skala nilai sukrosa

Hitung % padatan terlarut (sebagai sukrosa) setara dengan hasil pembacaan pada B.3.7 dan nyatakan hasilnya sampai 1 (satu) desimal

B.3.7 Ketelitian

Perbedaan hasil antara dua penetapan tidak boleh lebih dari 5 % untuk produk yang mengandung padatan terlarut lebih besar dari 0,5 %

Tabel B.1 - Koreksi Pembacaan Refraktometer dengan Skala Indikasi Sukrosa untuk Perbedaan Suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Pembacaan skala untuk padatan terlarut, % (berdasar massa)									
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
	Koreksi untuk									
15	0,29	0,31	0,33	0,34	0,34	0,35	0,37	0,38	0,39	0,40
16	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,28	0,30	0,30	0,31	0,32
17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,23	0,23	0,24
18	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,16	0,16
19	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08
	Koreksi untuk ditambah									
21	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08

Tabel B.1 – (Lanjutan)

Suhu (°C)	Pembacaan skala untuk padatan terlarut, % (berdasar massa)									
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
22	0,13	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16
23	0,20	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24
24	0,27	0,28	0,29	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32
25	0,35	0,36	0,37	0,38	0,38	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40

Tabel B.2 - Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut (sukrosa)

Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)
1,3330	0	1,3672	22	1,4076	44	1,4558	66
1,3344	1	1,3689	23	1,4096	45	1,4582	67
1,3359	2	1,3706	24			1,4606	68
1,3373	3	1,3723	25	1,4117	46	1,4630	69
1,3388	4			1,4137	47	1,4654	70
1,3403	5	1,3740	26	1,4158	48		
		1,3758	27	1,4179	49	1,4679	71
1,3418	6	1,3775	28	1,4201	50	1,4703	72
1,3433	7	1,3793	29			1,4728	73
1,3448	8	1,3811	30	1,4222	51	1,4753	74
1,3463	9			1,4243	52	1,4778	75
1,3478	10	1,3829	31	1,4265	53		
		1,3847	32	1,4286	54	1,4803	76
1,3494	11	1,3865	33	1,4308	55	1,4829	77
1,3509	12	1,3883	34			1,4854	78
1,3525	13	1,3902	35	1,4330	56	1,4880	79
1,3541	14			1,4352	57	1,4906	80
1,3557	15	1,3920	36	1,4374	58		
		1,3939	37	1,4397	59	1,4933	81
1,3573	16	1,3958	38	1,4419	60	1,4959	82
1,3589	17	1,3978	39			1,4985	83
1,3605	18	1,3997	40	1,4442	61	1,5012	84
1,3622	19			1,4465	62	1,5039	85
1,3638	20	1,4016	41	1,4488	63		
		1,4036	42	1,4511	64		
1,3655	21	1,4056	43	1,4535	65		

B.4 Cara uji bahan tambahan pewarna

B.4.1 Cara kromatografi kertas menggunakan benang wol

B.4.1.1 Prinsip

Penyerapan zat warna contoh oleh benang wol dalam suasana asam dengan pemanasan, dilanjutkan dengan pelarutan benang wol yang telah berwarna.

B.4.1.2 Peralatan

- Gelas piala 10 mL, 100 mL, 250 mL ;
- Pengaduk kaca;
- Bejana kromatografi;
- Penangas air;
- Benang wol bebas lemak;
- Kertas saring biasa;
- Kertas saring Whatman no. 1.

B.4.1.3 Pereaksi

- a) Asam asetat glasial p.a;
- b) Larutan asam asetat 6 %;
- c) Amonia NH_4OH , Bj 0,88;
- d) Larutan baku zat warna makanan;
- e) Larutan elusi (pilih salah satu):
 - larutan elusi I : campuran (perbandingan volume) n.butanol : asam asetat glasial : air = 4 : 5 : 1
 - larutan elusi II : campuran (perbandingan volume) iso butanol : etanol : air = 3 : 2 : 2
 - larutan elusi III : larutan NaCl 2 % dalam alkohol 50 %
 - larutan elusi IV : campuran (perbandingan volume) etil metil keton : asam asetat : air = 7 : 3 : 3

B.4.1.4 Cara kerja**B.4.1.4.1 Persiapan benang wol bebas lemak**

Ekstrak/rendam benang wol dengan eter atau petroleum

B.4.1.4.2 Penarikan warna dengan benang wol

- a) sari buah mangga umumnya sudah bereaksi asam, sehingga dapat langsung dilakukan penarikan zat warna dengan benang wol. Jika reaksinya tidak asam, harus diasamkan sedikit dengan penambahan asam asetat atau kalium hidrogen sulfat (KHSO_4).
Contoh yang diperiksa 30 mL – 50 mL
- b) masukkan benang wol secukupnya ke dalam contoh yang sudah dipersiapkan tadi. Panaskan di atas api sambil diaduk-aduk selama 10 menit. Ambil benang wol, cuci berulang-ulang dengan air hingga bersih
- c) masukkan benang wol ke dalam gelas piala 100 mL, tambahkan larutan amonia encer. Panaskan di atas penangas air hingga zat warna pada benang wol luntur. Ambil benang wolnya, saring larutan berwarna tersebut dan pekatkan di atas penangas air.
- d) totolkan pekatan pada kertas kromatografi, totolkan juga zat warna pembanding yang cocok (maksudnya: jika pekatan larutan berwarna merah gunakan zat warna pembanding warna merah)
- e) masukkan kertas tersebut ke dalam bejana kromatografi yang terlebih dahulu sudah dijenuhkan dengan uap elusi (pilih salah satu elusi yang cocok pada B.4.1.3.e)
- f) bandingkan R_f bercak contoh dengan R_f bercak standar.

CATATAN 1 zat warna yang larut dalam minyak akan memberi warna pada pelarut organik. Kalau ada kesukaran maka gunakan larutan 60 % – 90 % aseton atau alkohol yang mengandung 2 % amonia yang sedikit dihangatkan (dalam hal ini apti akan mengendap). Pelarut organik harus dihilangkan dahulu sebelum diasamkan

CATATAN 2 jarak rambatan elusi = 12 cm, penotolan = 2 cm dari tepi bawah kertas

CATATAN 3 untuk warna merah yang sukar dibebaskan dari benang wol dengan larutan amonia, gunakan pelarut alkohol 50 % sebagai pengganti amonia. Tolkan contoh dengan eluen III. Bila $R_f = 1$ berarti bahwa zat warna tersebut adalah Rhodamin B.

B.4.2 Cara kolom poliamida

B.4.2.1 Cara I

B.4.2.1.1 Prinsip

Penyerapan zat warna contoh oleh poliamida dilanjutkan dengan pelarutan zat warna yang telah bebas dari pengotor dalam NaOH metanolat. Pada pH tertentu dan setelah pekatan, perbandingan zat warna contoh dengan zat warna standar dilakukan secara kromatografi kertas.

B.4.2.1.2 Peralatan

- Kolom kromatografi;
- Gelas ukur;
- Buchi rotavapor atau yang sejenisnya;
- Bejana kromatografi;
- Pemanas listrik/teklu;
- Batang pengaduk;
- Kertas saring;
- Kertas saring Whatman no.1.

B.4.2.1.3 Pereaksi

- a) Aseton
- b) NaOH metanolat
- c) Larutan baku zat warna
- d) Larutan elusi (lihat B.4.1.3.e)
- e) Larutan asam asetat metanolat

B.4.2.1.4 Cara kerja

- a) Ambil 25 mL contoh, masukkan ke dalam kolom poliamida sepanjang 2 cm. Cuci zat warna yang terserap dengan 5 mL aseton sebanyak 5 kali dan kemudian tuangkan 5 mL air panas sebanyak 5 kali untuk menghilangkan pengotor, yaitu gula, asam dan sebagainya
- b) Elusi dengan 20 mL NaOH metanolat untuk melepas zat pewarna
- c) Atur pH larutan yang diperoleh menjadi 5 – 6 dengan cara menambahkan larutan asam asetat metanolat
- d) Uapkan larutan metanolat dengan alat Buchi rotavapor menjadi 1 mL. Selanjutnya lakukan seperti cara B.4.1.4.2.d dan seterusnya

B.4.2.2 Cara II

B.4.2.2.1 Prinsip

Penyerapan zat warna oleh poliamida, dilanjutkan dengan pelarutan zat warna dengan NaOH-metanol. Pada pH tertentu dan setelah pekatan, pembandingan zat warna contoh dengan zat warna standar dilakukan secara kromatografi kertas.

B.4.2.2.2 Peralatan

Tabung mikro kromatografi 15 x 150 mm dengan ukuran bagian bawah 3 x 100 mm.

B.4.2.2.3 Pereaksi

- Serbuk poliamida;
- Metanol-natrium hidroksida (larutkan 1 g NaOH dalam metanol 70 % dan encerkan sampai 1 liter);
- Metanol asam asetat (campurkan 100 mL metanol dengan 100 mL asam asetat glasial)
- Karboksimetil selulosa (CMC);
- Whatman ion exchange cellulose CM 22;
- Metanol-amonia (campurkan 95 mL metanol dengan 5 mL amonia Bj 0,88);
- Celite 545.

B.4.2.2.4 Cara kerja

- a) Hangatkan \pm 5 g contoh dengan air. Asamkan dengan beberapa tetes asam asetat (bila perlu), kemudian saring dengan bulu kaca (*glass wool*)
- b) Kocok saringan beberapa kali dengan 1 g poliamida. Bila supernatan masih berwarna, tambahkan lagi 0,5 g poliamida
- c) Masukkan poliamida ke dalam tabung mikro 15 x 150 mm dengan ukuran bagian bawah 3 x 100 mm
- d) Tutup bagian bawah tabung dengan bulu kaca dan biarkan cairan menetes
- e) Elusi poliamida dengan 10 mL air panas sebanyak 6 kali, dan 5 mL aseton sebanyak 3 kali. Sekali-sekali agitasi poliamida dengan pengaduk. Aseton akan menghilangkan warna yang bersifat basa sedangkan warna sintetik yang bersifat asam akan tertinggal dan terserap oleh poliamida bersama zat warna alam tertentu.
- f) Elusi poliamida dengan 5 mL metanol-NaOH sebanyak 2 kali. Eluen ditampung dan diatur pH-nya menjadi 5 – 6 dengan penambahan metanol – asam asetat. Tambahkan 10 mL air dan 0,5 g poliamida dan masukkan ke dalam tabung mikro yang lain. Poliamida dicuci dengan air panas sampai air yang keluar dari tabung mempunyai pH yang sama dengan air
- g) Elusi dengan 10 mL larutan metanol-NaOH dan eluen diasamkan dengan asam asetat, kemudian uapkan dan kerjakan seperti pada B.4.1.4.2.d dan seterusnya
- h) Untuk zat yang bersifat basa, pindahkan ke dalam tabung mikro yang mengandung 1 g "*Cation exchange resin*". Biarkan beberapa menit dan elusi dengan 5 mL air panas sebanyak 5 kali. Kemudian elusi dengan 3 bagian metanol-asam asetat sebanyak 2 kali, eluen dipekatkan dan dikerjakan seperti pada B.4.1.4.2.d dan seterusnya

B.5 Cemaran logam

B.5.1 Penetapan cemaran logam tembaga (Cu) dan timbal (Pb)

B.5.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

B.5.1.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL sampai 100 mL ;
- Penangas listrik;
- Kertas Whatman No. 41;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu dan Pb) terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL , 100 mL , dan 1000 mL , terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 mL ;
- Gelas piala 250 mL ;
- Penangas air.

B.5.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1N;
- d) encerkan 7 mL HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan asam klorida, HCl 6N;
encerkan 500 mL HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- f) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 % dalam alkohol;
larutkan 10 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan alkohol 95 % menjadi 100 mL .
- g) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cu;
larutkan 1,000 g Cu dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- h) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cu;
pipet 10 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cu ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cu.
- i) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cu;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cu ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cu.
- j) Larutan baku kerja Cu;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL ; 0,5 mL ; 1 mL ; 2 mL ; 4 mL ; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cu.

- k) Larutan baku 1000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 µg/mL siap pakai.
- l) larutan baku 50 µg/mL Pb;
pipet 5,0 mL larutan baku 1000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
- m) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

B.5.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- b) Tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 mL Mg(NO₃)₂·6H₂O 10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- c) Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) Apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) Keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) Larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6N atau 5 mL HNO₃ 1N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
- g) Jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring Whatman No.41 ke dalam labu ukur 50 mL;
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 324,7 nm untuk Cu dan 217 nm untuk Pb);
- j) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) Hitung konsentrasi logam dalam contoh.

B.5.1.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi logam (mg/kg)} = \frac{C}{n \times V}$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/mL);

V adalah volume larutan akhir, (mL);

m adalah bobot contoh, (g).

B.5.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11 %. Jika RSD lebih besar dari 11 % maka analisis harus diulang.

B.5.2 Penetapan timah (Sn)**B.5.2.1 Prinsip**

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian ditambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

B.5.2.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Erlenmeyer 250 mL ;
- Penangas listrik;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL , 100 mL , dan 1000 mL , terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 50 mL ;
- Gelas piala 250 mL ;
- Penangas air.

B.5.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K ;
- b) Larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL .
- c) Asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- d) Asam klorida pekat, HCl pekat;
- e) Larutan baku 1000 mg/l Sn ;
Larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 mL , tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Larutan baku kerja Sn .
Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL ; 0,5 mL ; 1,0 mL ; 1,5 mL ; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn .

B.5.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 30 g sampai 40 g dengan teliti ke dalam erlenmeyer 250 mL, keringkan menggunakan oven pada suhu 120 °C, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat;
- b) Panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) Lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) Angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- e) Tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai 15 mL ;

- f) Tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling;
- g) Tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan hingga tanda garis dengan air suling dan saring.
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$;
- j) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) Lakukan pengerjaan duplo;
- m) Hitung konsentrasi logam dalam contoh.

B.5.2.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Sn (mg/kg)} = \frac{C}{n \times V}$$

dengan:

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, (mL);

m adalah bobot contoh, (g).

B.5.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11 %. Jika RSD lebih besar dari 11 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.6 Cemarkan arsen (As)

B.6.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.6.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu Kjeldahl 250 mL;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, 500 mL, dan 1000 mL terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Pipet volumetrik 25 mL;
- Cawan porselen kapasitas 50 mL.
- Gelas ukur 25 mL
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi.

B.6.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- c) Atrium boronhidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL .
- d) Asam klorida, HCl 8M;
larutkan 66 mL HCl 37 % kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL ;
Larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- h) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
Larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
Pipet 10 mL larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As;
Pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
Pipet masing-masing 1,0 mL ; 2,0 mL ; 3,0 mL ; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

B.6.4 Cara kerja**B.6.4.1 Pengabuan basah**

- a) Timbang 15 g sampai 30 g contoh ke dalam labu Kjeldahl 250 mL , tambahkan 5 mL sampai 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) Tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) Dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL ammonim oksalat jenuh;
- e) Panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) Dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;

- g) Pipet 25 mL larutan di atas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M; 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Tambahkan larutan pereduksi NaBH_4 ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- m) Lakukan pengerjaan duplo;
- n) Hitung konsentrasi As dalam contoh.

B.6.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 pekat kemudian tutup rapat.
- b) Masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) Setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) Pipet 10 mL larutan diatas kedalam labu dasar bulat 50 mL , tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, panaskan menggunakan penangas listrik hingga kering kemudian abukan pada tanur dengan suhu 450 °C;
- e) Pinginkan, larutkan dengan 2 mL HCl 8 M; 0,1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit;
- f) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- g) Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- h) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- i) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- k) Lakukan pengerjaan duplo;
- l) Hitung konsentrasi As dalam contoh.

B.6.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi As (mg/kg)} = \frac{C}{n \times V}$$

dengan:

C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, (mL);

m adalah bobot contoh, (g).

B.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.7 Cemarkan mikroba

B.7.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri coliform, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, dan Kapang/Khamir

B.7.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.7.1.2 Larutan pengencer

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| - <i>Buffered Pepton Water</i> (BPW) | |
| - Pepton | 10 g |
| - Natrium klorida | 5 g |
| - <i>Disodium hydrogen phosphate</i> | 3,5 g |
| - <i>Kalium dihydrogen phosphate</i> | 1,5 g |
| - Air suling | 1000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan larutan tersebut ke dalam botol 500 mL. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

B.7.1.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril;
- Tabung reaksi;
- Alat pembuka kemasan steril;
- Pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, 500 mL, dan 1000 mL terkalibrasi;
- Penangas listrik.

B.7.1.4 Cara kerja

- a) Pipet 25 mL contoh dan masukkan ke dalam botol yang telah berisi 225 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10.
- b) Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.7.2 Angka lempeng total (metoda *plate count*)

B.7.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 24 jam sampai 48 jam pada suhu 35 °C ± 1 °C

B.7.2.2 Peralatan

- Cawan petri gelas/plastik diameter 90 mm – 100 mm steril;
- Pipet ukur 1mL , 5 mL , dan 10 mL ;
- Penangas air;
- Lemari pengering (inkubator);
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- Autoklaf;
- Oven/alat sterilisasi kering.

B.7.2.3 Pembenihan dan pengencera) *Plate count agar* (PCA)

- | | |
|---------------------------------------|---------|
| - <i>Pancreatic digest of Caseine</i> | 5 g |
| - <i>Yeast extract</i> | 2,5 g |
| - Glukosa | 1 g |
| - Agar | 15 g |
| - Air suling | 1000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan 450 mL larutan tersebut ke dalam botol-botol berukuran 500 mL. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

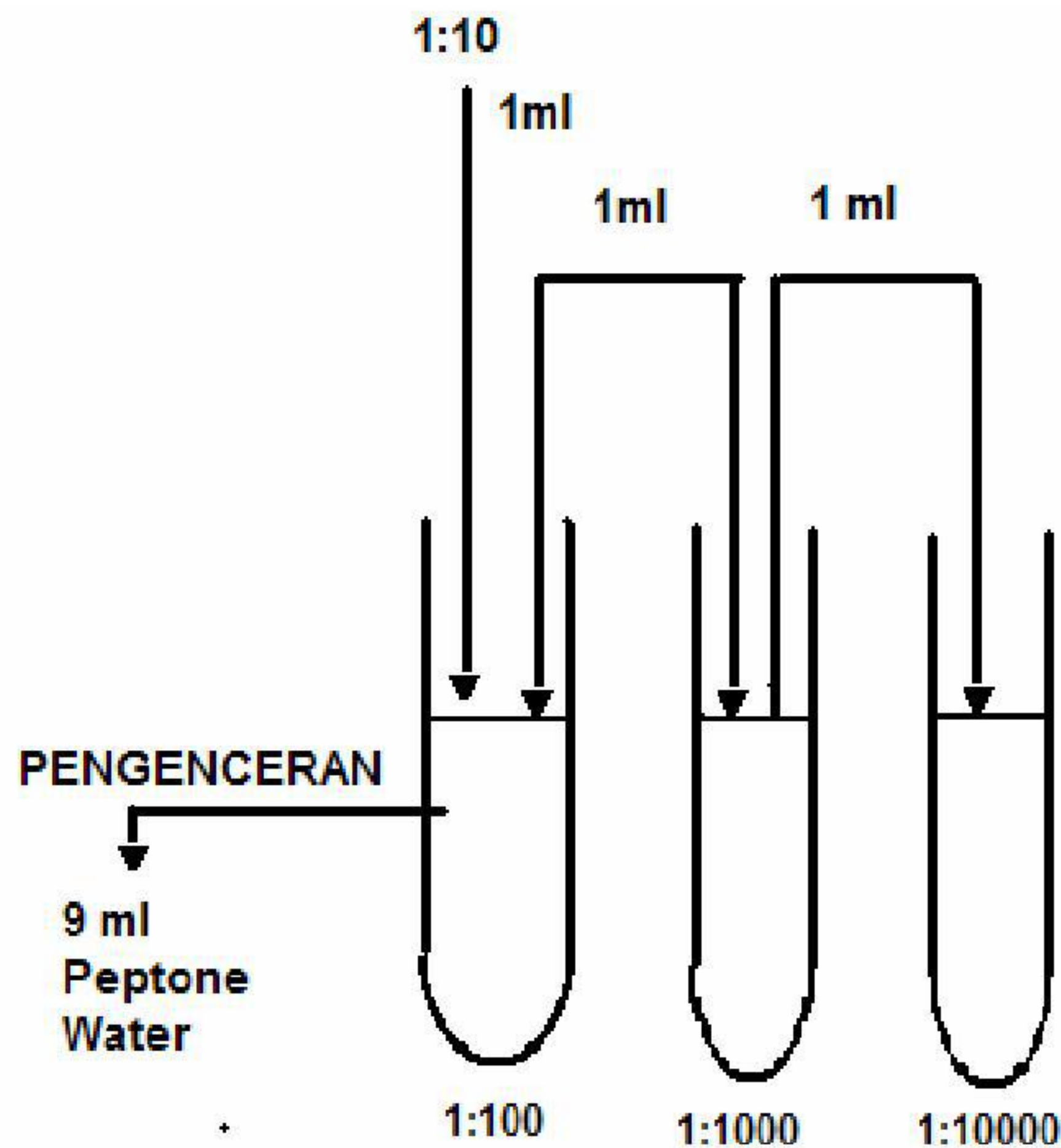
b) *Buffered peptone water* (BPW)

- | | |
|----------------------------|---------|
| - <i>Peptone</i> | 10 g |
| - Natrium klorida | 5 g |
| - Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| - Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| - Air suling | 1000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet ke dalam tabung-tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

B.7.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar B.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Buffered peptone water*



Gambar B.1 - Metoda pengenceran

- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran 10^1 – 10^4 ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- Tuangkan 12 mL – 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- Biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam sampai 48 jam;
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni – 250 koloni setelah 48 jam;

B.7.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

dengan:

n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, (koloni/mL);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.7.2.6 Pernyataan hasil

B.7.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni – 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.

- 2 Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni – 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri dalam satuan koloni /mL.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- 3 Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per ml dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- 4 Jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.

- a) Jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- b) jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

10^{-2}	10^{-3}	rea (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~ 7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 =$	$> 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~ 6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 =$	$> 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- 5 Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah .
- 6 menghitung koloni perambat.
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
 - a) Merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - b) Perambat yang terjadi di antara dasar cawan petri dan pembenihan;
 - c) Perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.
 Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu.
Jika terbentuk satu atau lebih rantai dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

B.7.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- 1 Jika angka ke tiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas.
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- 2 Jika angka ke tiga kurang dari 5 maka bulatkan ke bawah.
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- 3 Jika angka ke tiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
 - a) Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.
contohnya: 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - b) Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

B.7.3 Bakteri *coliform* dan *Escherichia coli*

B.7.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

B.7.3.2 Peralatan

- Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- Pipet Mohr 1 mL dan 10 mL berskala;
- Botol pengenceran (± 20 mL) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- Lemari pengering (inkubator), $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$;
- Tabung reaksi dan tabung Durham;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $45,5^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$.

B.7.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth/Lauryl tryptose (LST) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *E. C. Broth*;
- d) *Levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- e) *Plate Count Agar (PCA)* dalam tabung-tabung miring ;
- f) Gram stain;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;

- h) Pereaksi Kovacs;
- i) MR - VP broth;
- j) Pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) Larutan *Methyl Red*;
- l) *Koser's Citrate Medium*;
- m) *Bacto Peptone Water* 9 mL dalam tabung-tabung steril;
- n) Pereaksi *Indole*;
- o) Larutan kalium hidroksida 40 %;
- p) *A-naftol*;
- q) Kreatin.

B.7.3.4 Cara kerja

B.7.3.4.1 *Presumptive test* untuk bakteri *coliform* (uji dugaan)

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.7.1
- b) Inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Laurryl Tryptose Broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) Masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama 48 jam ± 2 jam;
- d) Amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- (24 ± 2) jam jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi 48 jam ± 2 jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif;
- g) Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

B.7.3.4.2 *Confirmed Test* untuk bakteri *coliform* (uji penegasan)

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % ke dalam inkubator pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam ± 2 jam;
- d) Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel B.4, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama 48 jam ± 2 jam pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- e) Laporkan sebagai APM bakteri *Coliform* per gram.

B.7.3.4.3 *Confirmed Test* untuk uji *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung *EC broth* yang berlainan;
- c) Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama 48 jam ± 2 jam pada $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Penangas air dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.;
- d) Periksa tabung EC tersebut pada jam ke- 48 jam ± 2 jam jika telah terbentuk gas dalam jumlah berapapun maka tabung tersebut dinyatakan "positif";

- e) Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati;
- f) Goreskan/tanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm
- g) Inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai 24 jam pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- h) Periksa pinggan - pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam;
- i) Dari tiap pinggan L-EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia;
- j) Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 jam sampai 24 jam pada 35°C . Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, *E. coli* adalah bakteri Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora;
- k) Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC;

- **Pembentukan indol**

- Inokulasi tabung *tryptone broth*.
- Inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada 35°C .
- Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 mL sampai 0,3 mL pereaksi Kovacs'.
- Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.

- **Reaksi voges proskauer dan methyl red**

- Inokulasi tabung medium MR-VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada 35°C .
- Secara aseptis pindahkan 1 mL biakan tabung reaksi steril.
- Tambahkan 0,6 mL larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 mL larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.
- Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
- Tabung medium MR-VP yang semula diinkubasikan kembali selama 48 jam pada 35°C .
- Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung.
- Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.

- **Penggunaan sitrat**

- Dengan hati - hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
- Inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35°C
- Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).

- **Pembentukan gas dari lactose**

- Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C .
- Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

B.7.3.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel B.3 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrate
Escherichia Coli				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila uji IMVIC adalah + + - - atau - + - -, Pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak bersepora atau coccus yang

membentuk gas dalam kaldu LST dengan waktu inkubasi 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C

- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan tabel APM berdasarkan jumlah tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel B.4 - APM/mL contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 mL; 0,01 mL; dan 0,001 mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

B.7.4 *Staphylococcus aureus* (metode plate count)

B.7.4.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada perbenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

B.7.4.2 Peralatan

- Spreader steril;
- Botol pengencer 500 mL ;
- Tabung reaksi;
- Gelas ukur 10 mL ;
- Cawan petri;
- Gelas sediaan;
- Inkubator 35 °C;
- Pipet ukur;
- Jarum ose/inokulasi.

B.7.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Baird parker* agar;
- b) *Brain heart infusion broth* (BHIB);
- c) Plasma kelinci.

B.7.4.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.6.1
- b) Pipet masing-masing 0,3 mL ; 0,3 mL dan 0,4 mL larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing 3 cawan petri yang berisi media BPA.
- c) Sebarkan contoh secara merata dengan menggunakan spreader steril. Tahan cawan pada posisi tegak lurus sampai contoh terserap oleh medium (\pm 10 menit). Apabila contoh tidak mudah diserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus didalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- d) Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai 48 jam;
- e) Pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai 200 koloni dan hitung tersangka koloni *S. Aureus* dengan ciri yaitu koloni berbentuk bulat, licin, basah, berdiameter 2 mm sampai 3 mm, berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran buram di sekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih. Koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum inokulasi

B.7.4.5 Uji koagulase

- a) Pindahkan koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai 0,3 mL *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- b) Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai 24 jam;
- c) Tambahkan koagulase plasma kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam kultur BHIB dan campurkan keduanya;
- d) Inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai 24 jam dan memeriksanya setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *S. aureus*;
- e) Rata-ratakan koloni dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencerannya.

B.7.4.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/mL) = $n \times F$

dengan:

n adalah jumlah rata-rata koloni dari 3 cawan petri;

F adalah faktor pengenceran.

B.7.5 Salmonella**B.7.5.1 Prinsip**

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella*.

B.7.5.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Kertas pH;
- Pipet 10 mL ;
- Pipet tetes;
- Botol pengencer 1000 mL ;
- Tabung reaksi;
- Gelas ukur 10 mL dan 100 mL ;
- Cawan petri 90 mm -100 mm dan 140 mm -150 mm;
- Gelas sediaan;
- Inkubator 35 °C;
- Oven;
- Penangas air;
- Pengaduk gelas;
- Sengkelit (ose)/ jarum inokulasi;
- Pensil lilin;
- Bunsen;
- Autoklaf.

B.7.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Selenite cystine broth*;
- b) *Tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant broth*);
- c) *Xylose lysine desoxycholate broth (XLD)*;
- d) *Hektoen enteric agar (HE)*;
- e) *Bismuth sulfite agar (BSA)*;
- f) *Triple sugar iron agar (TSI)*;
- g) *Buffered glucose broth (MR-VP medium)*;
- h) *Urea agar*;
- i) *Lactose broth*;
- j) *Lysin iron agar (LIA)*;
- k) Pereaksi *indol* dan perbenihan *indol*;
- l) *Lysin dextraxylation medium (LDC)*;
- m) *Nutrien agar*;
- n) Pereaksi *kovacs* ;
- o) *Polyvalent somatic (o) test*;
- p) *Polyvalent flagellar (h) test*;
- q) *HCl*;
- r) *NaOH*;
- s) Larutan *physiological saline* 0,85 %;
- t) Larutan *potassium hydroxide* 40 %;
- u) Larutan *formalized physiological saline*;
- v) *Rapid urea broth*;
- w) *Mac Conkey agar*;
- x) *Simmon citrate agar*;
- y) *Tryptone broth*.

B.7.5.4 Cara kerja**B.7.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan**

- a) Pipet 25 mL contoh ke dalam botol pengencer 500 mL dan tambahkan 225 mL *lactose broth*. Kocok hingga tercampur merata;

- b) Biarkan pada suhu ruang selama 60 menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai $(6,8 \pm 0,2)$;
- c) Kendurkan tutup wadah secukupnya/ $\frac{1}{4}$ putaran. Inkubasikan selama 24 jam \pm 2 jam pada 35 °C

B.7.5.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) Pipet 10 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 100 mL *selenite cystine broth* atau pipet 10 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 100 mL *tetrathionate broth*;
- c) Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 24 jam \pm 2 jam.

B.7.5.4.3 Penanaman pada perbenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- b) Ulangi cara di atas dari media pengkayaan SCB;
- c) Inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- d) Amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*.

Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media agar selektif setelah 24 jam \pm 2 jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut:

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE

HE: koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam

BS: koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media di sekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap di sekitar media

- e) Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi 24 jam \pm 2 jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama 24 jam \pm 2 jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi 48 jam \pm 2 jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas.
- f) Dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu 5 °C \pm 8 °C.
- g) Inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama 24 jam \pm 2 jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung.

Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk H_2S pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA.

- h) Semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada goresannya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai No. f di atas.
- i) Lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - Tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, SCB ;
 - Jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 mL contoh minuman sari buah.

B.7.5.5 Identifikasi *Salmonella*

B.7.5.5.1 Kultur campuran

Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *MacConkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* :

- a) *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- b) *Hektoen Enteric* (HE) agar. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
- c) *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti pada B.7.5.4.3.f dan lanjutkan seperti pada B.7.5.4.3.g

B.7.5.5.2 Kultur Murni

- a) Uji urease (konvensional)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam Urea agar. Inkubasikan selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C;
- b) Uji Urease (cepat)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam water bath pada suhu 37 °C \pm 0,5 °C. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna);

B.7.5.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB)
uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C, tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya;
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;
Inokulasi media *broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB)
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :
 1. *potasium cyanida* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan
 2. *malonate broth*
Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 3. uji indol
Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 mL sampai 0,3 mL pereaksi kovacs. Amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai +
Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

B.7.5.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - 1) *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau 2) *Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL kultur di atas;
- b) Siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella* polyvalent *flagellar* (H) antisera. Masukkan \pm 0,5 mL larutan *saline Salmonella* polyvalent *flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi

10 x 75 mm atau 13 x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.

Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

Negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

Non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol

B.7.5.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic (o)*

- Dengan menggunakan pensil lilin, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- Emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai 48 jam dengan 2 mL 0,85 % *saline* menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- Tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- Tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polivalen somatic (o)* antiserum ke dalam bagian yang lain;
- Campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit ;
- Klasifikasi tes *polyvalent somatic (o)* menunjukkan hasil sebagai berikut :
Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes, pada kontrol salin tidak terjadi penggumpalan;

Negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran tes, pada kontrol salin tidak terjadi penggumpalan

Tidak spesifik : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran tes dan pada kontrol salin

B.7.5.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada [Tabel 4 butir 1 -11](#). Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 mL contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar (H)* tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada B.7.5.5.1 diatas dan uji kembali pada B.7.5.5.2.

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel B.5:

- Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*

Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;

Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada

tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi lactose positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*;

b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*

Ikuti prosedur seperti pada B.7.5.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;

c) *Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C;

Lakukan uji Voges-Proskauer (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

Pindahkan 1 mL *MR-VP broth* yang telah diinkubasi selama 48 jam \pm 2 jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali *MR-VP broth* selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C. Tambahkan 0,6 mL *alpha naftol* dan aduk. Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Samonella* memberikan reaksi VP negatif;

Uji merah metil (MR)

Tambahkan 5 tetes indikator merah metil kedalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif;

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif

d) *Simmons citrate agar*

Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama 96 jam \pm 2 jam pada suhu 35 °C;

Positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil *citrate* positif

Negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna

B.7.5.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.5. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.6. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari B.7.5.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel B.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella*

No.	Test Subrat	Hasil Reaksi Positif	Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi species ^a
1.	<i>Glucose</i>	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2.	<i>Lysine Decarboxylase (LIA)</i>	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
4.	<i>Urease</i>	Warna ungu sampai merah	-	-
5.	<i>Lysine Decarboxy Broth</i>	Warna ungu	Warna kuning	+
6.	<i>Phenol Red Dulcitol Broth</i>	Warna kuning dengan/ gas	Tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7	<i>KCN broth</i>	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	Warna biru	Tidak berubah warna	- ^c
9	<i>Indol test</i>	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10	<i>Polyvalent flagellar test</i>	aglutinasi	Tidak aglutinasi	+
11	<i>Polyvalent somatic test</i>	aglutinasi	Tidak aglutinase	+
12	<i>Phenol red lactose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14	<i>Voges-prokquer test</i>	Ungu sampai merah	Tidak berubah warna	-
15	<i>Methyl red test</i>	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16	<i>Simmons Citrate</i>	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	V
Keterangan: ^a + : 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari - : 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari V : Variabel ^b : Mayoritas dari kultur Arizona: negatif ^c : Mayoritas dari kultur Arizona: positif				

Tabel B.6 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella*

No	Test Substrat	Hasil
1	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu-merah)
2	<i>Test indol dan test polivalen flagellar (H)</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase dan KCN broth</i>	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^b
6	<i>Voges-prokquer test methyl red test</i>	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)

CATATAN
^a test *malonate broth* positif lebih kanjut untuk mengamati jika biakan tersebut *Salmonella arizonate*
^b jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan *Salmonella*, uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut *Salmonella*

B.7.6 Kapang /khamir

B.7.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang/khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari.

B.7.6.2 Pembenihan dan pengencer

- a) *Peptone dilution fluid* atau *pepton water*
b) PDA (*Potato Dextrose Agar*) atau pembenihan yang lainnya (*Mycophil*, *Malt Extract Agar*) yang ditambah dengan antibiotik klorotetrasiklin atau kloramfenikol atau streptomisin (250 mL pembenihan ditambah dengan 1 mL larutan 1 g antibiotik dalam 100 mL air suling steril)

c) PDA (*Potato Dextrose Agar*)

- *Infusion from white potatoes* 200 g
- *Dextrose* 20 g
- *Agar* 15 g
- Air suling 1 liter

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121°C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50°C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10% steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 mL antibiotik (1 g/ 100mL). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam piringan petri.

B.7.6.3 Peralatan

- Cawan petri (100 x 15 mm);
- Pipet ukur 1 mL dan 10 mL ;
- Penangas air $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Lemari pengeringan 25°C atau suhu kamar;
- Alat penghitung koloni ;
- Mikroskop.

B.7.6.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti B.7.1

- b) Pipet 1 mL dari masing-masing pengenceran $10^1 - 10^2$ ke dalam cawan petri steril secara duplo. Tuangkan PDA yang telah dicairkan atau perbenihan lainnya (suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) sebanyak 15 mL – 20 mL ke dalam cawan petri dan goyangkan cawan petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
- c) Setelah pembedihan membeku, inkubasikan pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari (tanpa dibalik)
- d) Hitung koloni kapang/khamir (dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai ke lima)
- e) Laporkan atau catat hasil sebagai jumlah kapang/khamir dalam satuan koloni/mL contoh

B.7.6.5 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan factor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang/khamir dalam satuan koloni/mL .

CATATAN 1 Koloni kapang biasanya buram dan berbulu

CATATAN 2 Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam)

CATATAN 3 Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang/khamir



Bibliografi

CODEX Alimentarius Commission. 2005. CODEX Standard For Fruit Juice and Nectars. CODEX STAN 247-2005.

CODEX Alimentarius Commission. 1996. FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Foods (AQL-6.5). CAC/RM 42-1969

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method, 17th Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 17th edition, Chapter 9.2.35.

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods, 17th Edition, Chapter 17.2.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 967.25, Salmonella in Foods, Preparation of culture media and reagents. 17th Edition, Chapter 17.9.01.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Aerobic Plate Count. 8th edition. Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Escherichia coli and Coliform Bacteria. 8th edition. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Staphylococcus aureus. 8th edition. Chapter 12.

International Standard ISO 2173:2003. Fruit and Vegetable Products – Determination of Soluble Solids – Refractometric Method.

SNI (cara uji pewarna)

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Mold, Yeast and Mycotoxin. 8th edition. Chapter 18.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id